FACULTE DE MEDECINE
BROUSSAIS – HOTEL DIEU
UNIVERSITE PARIS VI

ANNEE 1972

THESE

N° 79

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE
(Diplome d'Etat)

PAR
Patrice CALLARD
Né le 8 Septembre 1941 à EL BIAR (ALGER)
Interne des Hopitaux de PARIS

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

ETUDE ULTRA STRUCTURALE DU GLOMERULE ET DES CELLULES MUSCULAIRES ARTERIOLAIRES DU REIN DE RAT APRES TRYPSINISATION

Président : Monsieur Paul MILLIEZ, Professeur

FACULTE DE MEDECINE
BROUSSAIS – HOTEL DIEU
UNIVERSITE PARIS VI

ANNEE 1972 **THESE** N°

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE
(Diplome d'Etat)

PAR
Patrice CALLARD
Né le 8 Septembre 1941 à EL BIAR (ALGER)
Interne des Hopitaux de PARIS

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

ETUDE ULTRA STRUCTURALE DU GLOMERULE ET DES CELLULES MUSCULAIRES ARTERIOLAIRES DU REIN DE RAT APRES TRYPSINISATION

Président : Monsieur Paul MILLIEZ, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aux Miens

A mes Amis

à Monsieur le Professeur P. MILLIEZ

qui a bien voulu nous

faire l'honneur de présider

cette thèse, et qui non seulement

nous a enseigné la Médecine,

mais également montré ce que

devaient être les relations

entre le malade et son médecin.

Qu'il trouve ici l'expression

de ma profonde et respectueuse

reconnaissance.

À Monsieur le Professeur P. MILLIEZ

qui a bien voulu nous

faire l'honneur de présider

cette thèse, et qui non seulement

nous a enseigné la Médecine,

mais également montré ce que

devaient être les relations

entre le malade et son médecin.

Qu'il trouve ici l'expression

de ma profonde et respectueuse

reconnaissance.

à Monsieur le Professeur J. BARIETY

qui nous a inspiré le sujet

de cette thèse, et dont la

quotidienne sollicitude nous a

été précieuse

à la mémoire de Monsieur le Professeur

J. DELARUE

qui a orienté de façon décisive

notre carrière médicale.

à Monsieur le Professeur P.Y. HATT

dont l'intelligence et la gentillesse

n'ont d'égal que l'enthousiasme

qu'il suscite chez ses élèves.

à Monsieur le Professeur J. DIEBOLD

à Messieurs les Docteurs J.P. CAMILIERI
R. KALIFAT
M. REYNES

qui nous ont enseigné l'Anatomie Pathologique,

guidé pas à pas dans les dédales de l'ultrastructure,

et qui nous honorent de leur amitié

SOMMAIRE

INTRODUCTION ..... Page 2

MATERIEL TECHNIQUE 3

I - RAPPEL DE LA MORPHOLOGIE NORMALE DE LA PAROI CAPILLAIRE GLOMERULAIRE 5

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX 6

1) RATS TEMOINS 6

2) ETUDE DES MODIFICATIONS NUCLEAIRES 8

A/ APRES INCUBATION DE 1 à 2 mg/ml

B/ APRES INCUBATION DE 2 à 4 mg/ml

3) ETUDE DES FILAMENTS CYTOPLASMIQUES DES CELLULES EPITHELIALES ET MESANGIALES 10

4) ETUDE DES MEMBRANES BASALES, DU RESEAU MEMBRANOIDE MESANGIAL 10

A/ MEMBRANE BASALE

B/ RESEAU MEMBRANOIDE MESANGIAL

C/ CELL COAT ET LA SLIT MEMBRANE

III - DISCUSSION 14

1) INCLUSIONS FILAMENTEUSES INTRANUCLEAIRES 14

2) FILAMENTS CYTOPLASMIQUES DES CELLULES DU GLOMERULE 15

3) CELL COAT, SLIT MEMBRANE ET MEMBRANE BASALE 16

A/ CELL COAT ET SLIT MEMBRANE

B/ MEMBRANE BASALE ET RESEAU MEMBRANOIDE MESANGIAL

à tous ceux et toutes celles

qui ont contribué à l'élaboration

de cette thèse ...

... et notamment :

- Mlle Chantal Meyer, qui nous a fait des coupes fines, sans shutters, sans trous, sans précipités

- Mr. WOLFSBERGER, photographe dont le beau talent est connu de tous

- Mr. ESCAIG J., qui nous a permis d'utiliser la platine goniométrique du Laboratoire d'Evolution des Etres Organisés

IV- ETUDE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES DES ARTERIOLES *18*

1) RAPPEL DE LA MORPHOLOGIE NORMALE DES MYOFILAMENTS DANS LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES *18*

2) CELLULES MUSCULAIRES LISSES ARTERIOLAIRES APRES TRYPSINISATION *19*

A/ TEMOINS

B/ APRES TRYPSINISATION

1) Filaments épais

2) Structures paracristallines

3) DISCUSSION *28*

A/ SIGNIFICATION DES FILAMENTS EPAIS

B/ SIGNIFICATION DES STRUCTURES PARACRISTALLINES

CONCLUSIONS *31*

BIBLIOGRAPHIE *32*

INTRODUCTION

La trypsinisation a été proposée par ROSENBLUTH, pour mettre en évidence, en microscopie électronique, des filaments de myosine dans la cellule musculaire lisse.

Nous avons appliqué cette technique au rein du rat afin de répondre à 2 questions :

1/ Existe-t-il dans les cellules du glomérule rénal des filaments de myosine identifiables au microscope électronique?

- De nombreux arguments suggèrent en effet que les cellules du floculus sont douées de propriétés contractiles et possèdent à la fois de l'actine et de la myosine :

  . existence d'actomyosine détectée par des anticorps anti-acto-myosine.
  . contractions rythmiques des glomérules en culture
  . observation de filaments épais après déshydratation inerte.

2/ Le muscle lisse artériolaire du rein de rat possède-t-il, après trypsinisation, le même aspect ultra-structural que les cellules musculaires des tuniques digestives des amphibiens ?

C'est en effet sur les myocytes de l'intestin de crapaud que ROSENBLUTH a pu décrire, à côté des filaments fins normalement observés, des filaments épais, losangiques, et considérés comme étant des agrégats de myosine, de méromyosine légère, ou bien d'un mélange des 2.

MATERIEL ET TECHNIQUE

Afin d'obtenir une digestion plus efficace et plus régulièrement reproductible, nous avons utilisé la perfusion aortique ce qui a également comme avantage de se débarasser du sang.

- Des rats Wistar (7 animaux) pesant entre 250 et 400 g sont anesthésiés à l'éther. Après ouverture de l'abdomen, un catheter (BECTON et DICKINSON) est introduit dans l'aorte, au niveau de la bifurcation aortique. Il faut veiller à ce que l'extrémité du catheter ne dépasse pas l'orificè des artères rénales. Un lac est passé sur l'aorte au-dessus des rénales.

- Un robinet à 3 voies est branché sur le catheter, ce qui permet d'utiliser successivement 2 solutions : l'une de Ringer contenant de l'héparine, la deuxième contenant la solution de trypsine. Ces 2 solutions sont contenues dans des flacons situés à 150 cm au-dessus de l'animal.

- Les reins sont d'abord perfusés avec la solution de Ringer héparinée. Dès le début de la perfusion, on pratique une brèche dans une veine rérale ou la veine cave, et on lie l'aorte au-dessus des rénales.

  Au bout de 5 minutes environ, on substitue la solution de Ringer par la solution contenant la trypsine. On perfuse ainsi 50 à 100 ml de solution, puis les reins sont découpés avec une lame de rasoir en petits fragments et plongés dans un flacon contenant une solution identique de trypsine. Le temps d'incubation varie de 1 à 4 heures ; habituellement à la température du laboratoire, mais parfois à 37°.

  Les reins témoins (4 animaux) sont perfusés uniquement avec une solution de Ringer tamponnée.

  Les solutions de trypsine sont préparées de la façon suivante :

  - solution de Ringer tamponnée par du Tris Hcl 0,1 M ajusté à pH 7,6
  - on ajoute à cette solution de la TRYPSINE * de façon à obtenir une concentration finale de 1, 2, ou 4 mg/ml (un précipité se forme rarement, il doit être filtré et peut être utilisé).

* TRYPSINE = MILES SERACAC (BERKS, ENGLAND.
Trypsine bovine 36.554).

- Lorsque les temps d'incubation sont terminés, les fragments sont fixés dans le glutaraldehyde à 2,5 % dans un tampon phosphate mono-dipotassique 0,1 M pH 7,4, pendant une heure, puis rincés une nuit dans le tampon.

- Le lendemain, les fragments sont post fixés dans le tetroxyde d'osmium à 1%, déshydratés, incubés dans l'Epon 812, et colorés par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

- Les treillis ont été examinés à l'aide d'un microscope Zeiss E.M9 à 40 KV, et d'un microscope Siemens Elmiskop 101 à 80 KV.

- Afin d'analyser les structures paracristallines, nous avons pu utiliser la platine goniométrique montée sur un microscope Phillips EM1 (Laboratoires d'Evolution des Etres organisés) qui permet une rotation de 360° dans le plan horizontal, et une inclinaison de + 60° (tilting)

- Dans certains cas, l'analyse de micrographies a été effectuée à l'aide d'un appareil que nous avons baptisé Interférographe, et construit par nous-même selon les plans de WARREN et HICKS.

Nous en ferons une brève description : la micrographie ou un contretype positif, est éclairée par une batterie de 20 ampoules à filament punctiforme, régulièrement espacées sur une rampe. Un tel système permet un renforcement des structures périodiques, et l'image de la micrographie est recueillie sur un verre dépoli ou un plan-film. Pour un écartement donné de la structure périodique, et une distance définie entre la micrographie et le verre dépoli, on observe une image des structures périodiques et un effacement du bruit de fond.

U n des inconvénients de ce dispositif est le faible contraste des images obtenues, ce qui nécessite des artifices photographiques : tirages successifs sur film hyper contraste KODALITH Super Ortho 2775.

I. RAPPEL DE LA MORPHOLOGIE NORMALE DE LA PAROI CAPILLAIRE GLOMERULAIRE

L'architecture des capillaires glomérulaires est indiquée sur le schéma de la figure 1 : l'axe des anses capillaires est constitué par la tige mésangiale qui comporte deux éléments :

- des cellules mésangiales aux limites irrégulières, possédant un cytoplasme dense car constitué en majeure partie de filaments.

- un réseau membranoïde mésangial dont on pense qu'il est de constitution voisine de celle des membranes basales.

Les capillaires ont une paroi complexe constituée de trois éléments (Figure 3).

- La cellule endothéliale dont la lamina fenestrata est très mince (500 à 1000 Å) et percée de perforations ou pores de 1000 Å environ qui, chez le rat, ne sont pas habituellement obturés par un diaphragme. Rhodin cependant a décrit chez la souris des diaphragmes obturant les pores des cellules endothéliales.

- La membrane basale épaisse de 1500 Å environ (mais cette épaisseur augmente avec l'âge de l'animal) possède trois couches :

  . l'une centrale, ou lamina densa, se révèle constituée d'un feutrage fibrillaire très fin, dont les fibres semblent parallèles au plan de la membrane basale.

  . l'autre interne ou lamina rara interna, très lâche.

  . la dernière externe ou lamina rara externa, peu dense également, et au sein de laquelle on peut voir de nombreuses microfibrilles qui sont perpendiculaires au plan de la membrane basale et amarrent les pédicelles sur la lamina densa.

- Les cellules épithéliales ou podocytes.

Les podocytes s'insèrent sur la membrane basale par l'intermédiaire des pédicelles, qui s'incrustent dans la lamina rara externa. Ils sont séparés les uns des autres par des interstices de 240 Å de largeur environ.
Entre chaque pédicelle est tendue une fine membrane : la «slit membrane» qui n'est vue que sur les sections qui lui sont strictement perpendiculaires et qui mesure 40 à 60 Å d'épaisseur.

La membrane plasmique des podocytes est tapissée d'un revêtement muco physaccharidique particulièrement visible, le «cell coat», dont l'épaisseur est de 100 à 150 Å.

Dans le cytoplasme des podocytes s'observent des microtubules et des microfilaments :

- les microtubules, de 200 Å de diamètre, sont orientés selon l'axe des prolongements cellulaires, et sont supposés être le squelette de la cellule (N.K. Wessells).

- les microfibrilles, de 50 à 100 Å de diamètre, appelés encore myofilaments, car elles ressemblent aux filaments trouvés dans le muscle lisse.

Ces fibrilles peuvent etre dispersées dans le cytoplasme, ou bien regroupés en faisceaux assez compacts. On les trouve à la fois dans le corps cellulaire, et dans les prolongements primaires ainsi que dans les pédicelles.

II. RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 - RATS TEMOINS

Des incubations de 1 à 2 heures dans une solution de Ringer tamponnée ne contenant pas de trypsine, entrainent des lésions dégénératives des tubes rénaux.

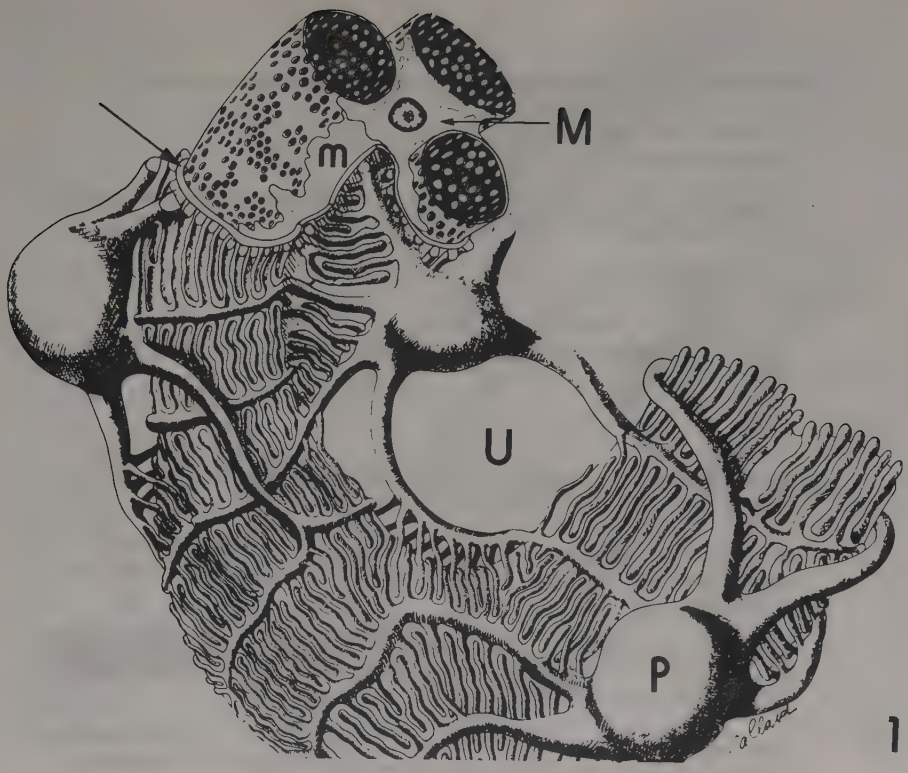
Par contre, on observe peu ou pas de modifications des capillaires glomérulaires. Le cytoplasme reste intact, il n'y a pas d'altérations nucléaires notables, et en particulier pas d'images filamenteuses nucléaires.

LEGENDES

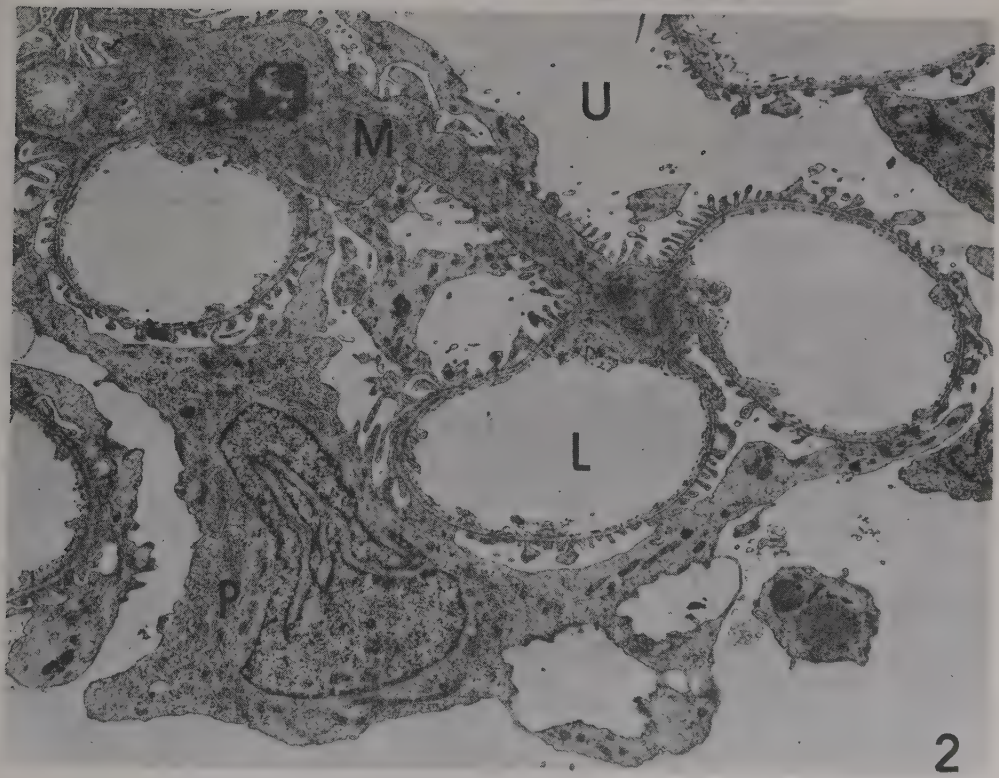
Figure 1 - *Shéma représentant une portion d'un lobule du floculus rénal : 3 anses capillaires sont disposées autour d'un axe composé de cellules mésangiales (M) et du réseau membranoïde mésangial (m). Les podocytes (P) émettent des prolongements à partir desquels naissent les pédicelles qui vont se fixer le long de la membrane basale (flèche) - U, espace urinaire.*

Figure 2 - *Rein témoin*
Aspect général des parois des capillaires glomérulaires : P, podocyte - L, lumière capillaire - M, cellule mésangiale englobée dans le matériel membranoïde U, espace urinaire.

G = 4.260



1



2

Ces résultats, assez inattendus, sont probablement dus au fait que :

- le sang a été substitué par le Ringer, et le fixateur n'a ainsi aucune difficulté à pénétrer rapidement l'échantillon,

- la solution est tamponnée (bien que nous n'ayons pas vérifié le pH de la solution en fin de manipulation).

2 - ETUDE DES MODIFICATIONS NUCLEAIRES

A/ APRES UNE INCUBATION DE DEUX HEURES DANS UNE SOLUTION CONTENANT 1 A 2 mg/ml DE TRYPSINE

Dans le nucléoplasme des cellules épithéliales et mésangiales, apparaissent des structures filamenteuses, formées par des faisceaux de fibrilles (figure 6).

Celles-ci, au nombre de 20 à 30 par faisceau, ont un diamètre de 80 à 100 Å environ. Leur longueur est variable, mais peut atteindre 3,6 microns, et même toute la largeur d'un noyau.

Elles ne contractent pas de rapport privilégié avec l'hétérochromatine, ni avec les corps nucléaires, mais sont parfois proches du nucléole. Lorsqu'elles atteignent la membrane nucléaire, c'est toujours au niveau d'un pore nucléaire.

Les coupes strictement transversales sont rares, mais nous ont permis de constater qu'il s'agissait bien de fibrilles et non de tubules.

Elles surviennent avec une grande fréquence et étant donné leur taille comparée à celle du noyau, nous sommes tentés dedire qu'elles sont constantes et surviennent dans tous les noyaux des cellules podocytaires et mésangiales.

LEGENDES

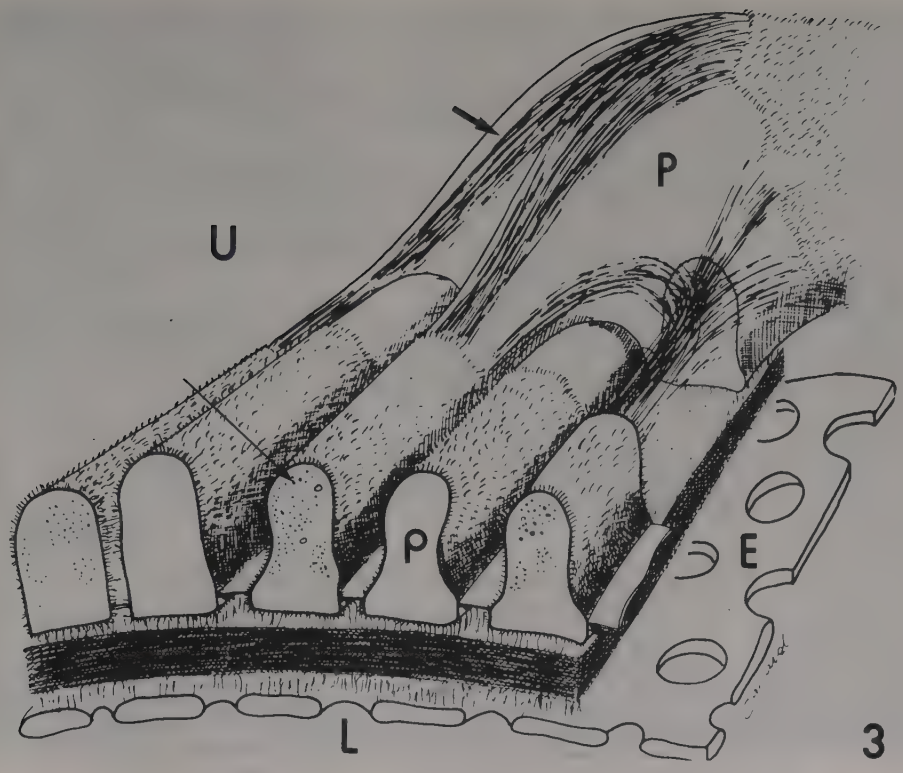
Figure 3 - *Shéma de la paroi capillaire*

A partir de la lumière vasculaire (L), on trouve successivement : la cellule endothéliale (E), avec ses perforations, constituant la lamina fenestrata ; La membrane basale et ses trois couches, et enfin les pédicelles (p) des cellules épithéliales. Ils sont recouverts de petites spicules figurant le «cell coat», et contiennent des filaments (longue flèche) qui se prolongent jusque dans le corps cellulaire du podocyte.
Les 2 pédicelles de gauche représenteraient, selon LATTA, l'état in vivo (l'espace entre les 2 pédicelles étant occupé par le cell coat), alors que l'aspect des 3 pédicelles de droite, généralement observé, serait du à un artéfactde fixation.

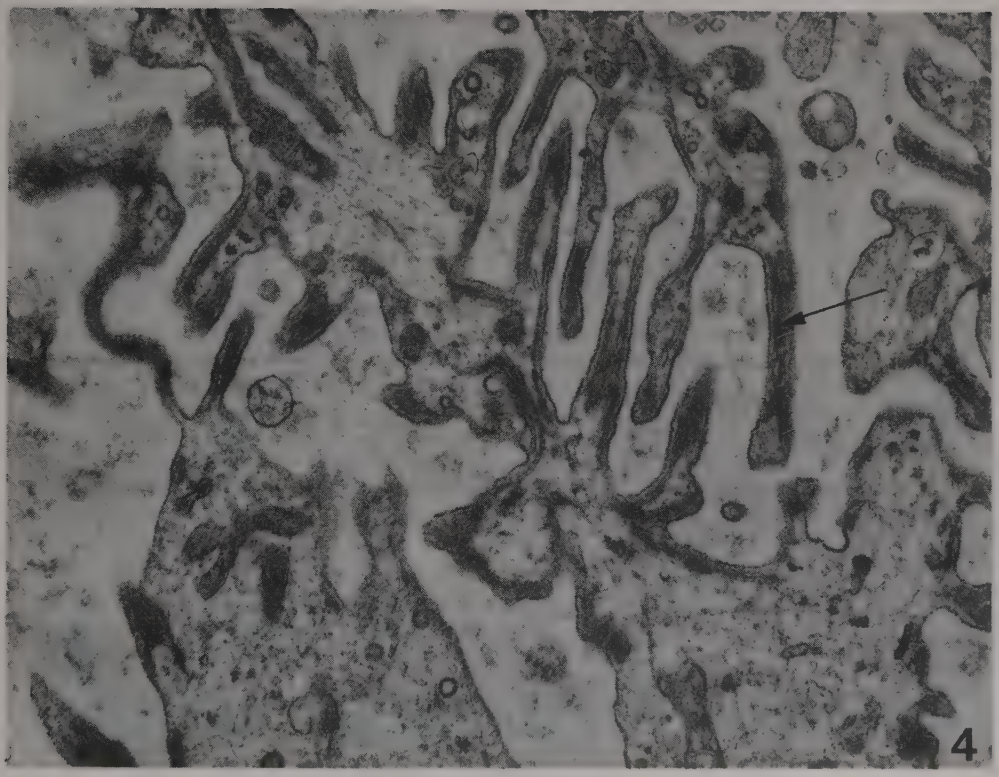
Figure 4 - *Rat témoin*

La coupe est parallèle aux pédicelles, mais n'intéresse pas la membrane basale. De nombreux filaments (flèche) sont orientés selon l'axe du pédicelle.

G = 18.800



3



4

Il n'en a jamais été observées dans les cellules endothéliales. Exceptionnellement, on en trouve dans les cellules musculaires lisses des artérioles.

B/ APRES UNE INCUBATION DE 2 A 4 HEURES DANS UNE SOLUTION CONTENANT 4 mg/ml DE TRYPSINE :

On retrouve toujours les mêmes structures filamenteuses, mais il s'y associe parfois un autre élément :

Il s'agit de structures également fibrillaires, mais présentant une périodicité (cartouche de la figure 6) et ayant des aspects variables selon l'incidence de coupe : traits parallèles entrecroisés, images de chevron, etc ... La périodicité de ces structures est de 180 à 210 Å.

Ce qui nous semble important est l'étroite association de structures périodiques et filamenteuses, bien que dans de rares cas, les images paracristallines puissent être trouvées seules.

3 - ETUDE DES FILAMENTS CYTOPLASMIQUES DES CELLULES EPITHELIALES ET MESANGIALES

- Quel que soit le temps d'incubation (1 à 4 heures), la concentration de la solution trypsique, la température (20° ou 37°), aucune modification des myofilaments des cellules épithéliales et mésangiales n'a pu être provoquée : ils ont toujours le même aspect et il n'a jamais été noté de filaments épais.

- Les microtubules disparaissent lorsque l'incubation est faite avec une solution concentrée de trypsine.

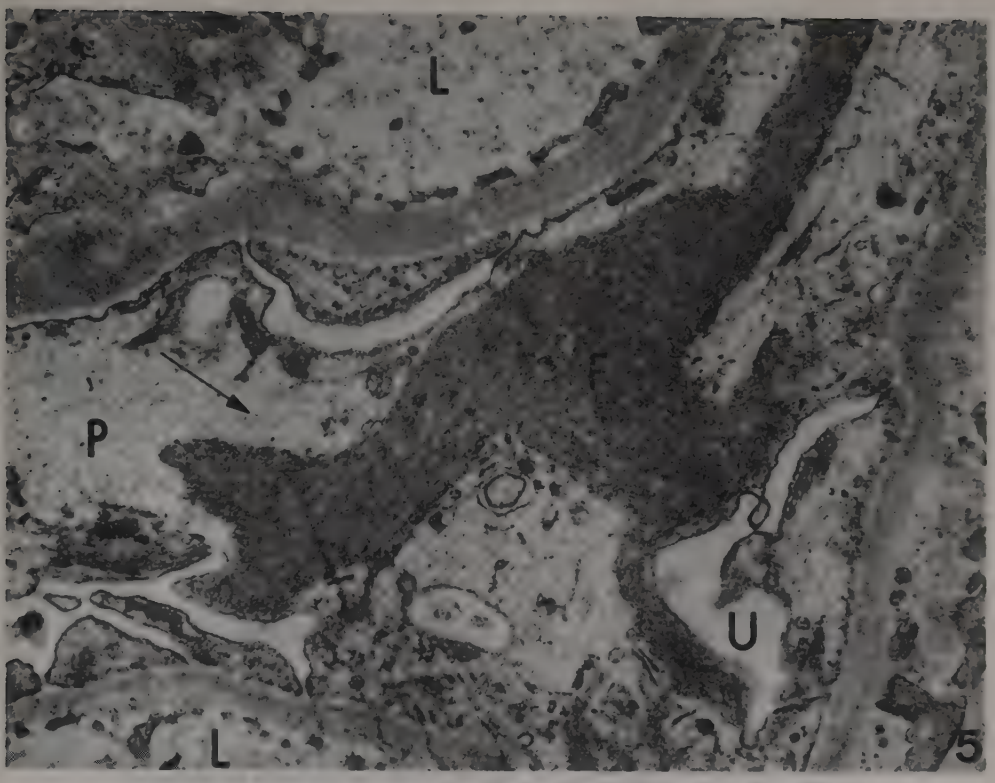
4 - ETUDE DES MEMBRANES BASALES, DU RESEAU MEMBRANOIDE MESANGIAL, ET DU CELL COAT

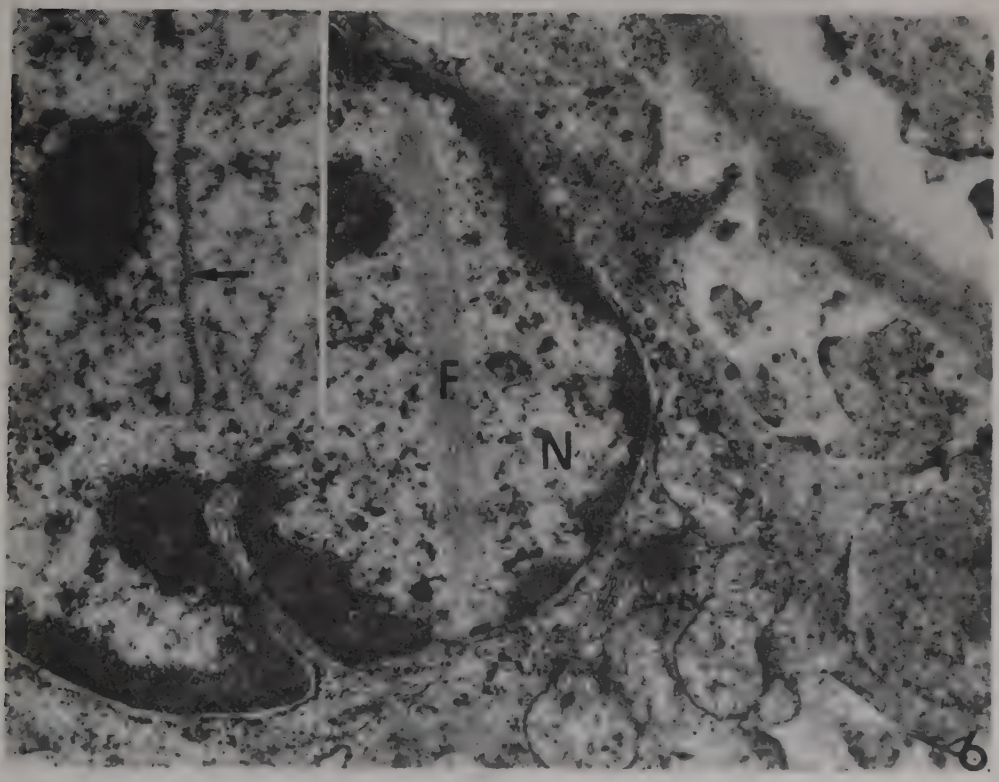
Nous regroupons en un même chapitre l'étude de ces trois constituants, car ils sont tous trois de nature glycoprotéique, et certains auteurs ont tendance à faire de la membrane basale une différentiation particulière du cell coat des cellules élaborant cette basale (J.P. THIERRY)

LEGENDES

Figure 5 - *Incubation trypsique (1 mg/ml) pendant 1 h. L'aspect de ce podocyte (P) est semblable à ceux des témoins. Il contient de volumineux trousseaux de microfibrilles (F), des microtubules, et, éparpillées dans le cytoplasme, quelques fibrilles isolées (flèche).*
L : lumière capillaire - U : espace urinaire.

Figure 6 - *Incubation trypsique (1 mg/ml) pendant 1 h.*
Noyau (N) d'une cellule mésangiale comportant un faisceau de filaments sinueux (F), qui mesure 2,6 µ de longueur.
G = 25.800
Le cartouche représente, à côté d'un nucléole, l'aspect périodique que prennent certaines inclusions filamenteuses (flèche).


L
P
U
L
5


F
N
6

De profondes altérations surviennent lorsque la concentration de la solution de trypsine atteint 4 mg/ml.

A/ LA MEMBRANE BASALE

Seule la lamina densa reste identifiable : en effet, les cellules épithéliales d'une part, et les cellules endothéliales d'autre part, se sont détachées de la membrane basale, et n'ont plus de relation avec elle (Figure 7).

La lamina densa conserve une densité électronique à peu près identique à celle de l'état normal, mais ses limites externe et interne sont moins nettes : de petites spicules et des microfilaments se voient à sa surface, vestiges probables des lamina rara, et lui confère des limites irrégulières et un peu floues (Figure 8).

B/ LE RESEAU MEMBRANOIDE MESANGIAL

Il est en grande partie digéré, contrairement à la lamina densa de la membrane basale, et est réduit à l'état de grisaille floue, de densité très diminuée par rapport aux témoins.

Aussi les limites des cellules mésangiales sont elles beaucoup plus visibles qu'à l'état normal, et les multiples pseudopodes sont très franchement dessinés, car leur contraste est resté inchangé. Les jonctions entre les cellules mésangiales sont rares.

C/ LE CELL COAT ET LA SLIT MEMBRANE

Le cell coat, ou glycocalyx, qui recouvre les cellules épithéliales et se traduit par des petites spicules sur le versant externe de la membrane plasmique, n'est plus visible, ou en tout cas, beaucoup moins nettement.

La slit membrane, qui unissait les pédicelles, a également disparu , si bien que ceux-ci s'écartent les uns des autres, et n'ont plus la belle régularité qu'ils possédaient lorsqu'ils étaient amarrés sur la membrane basale.

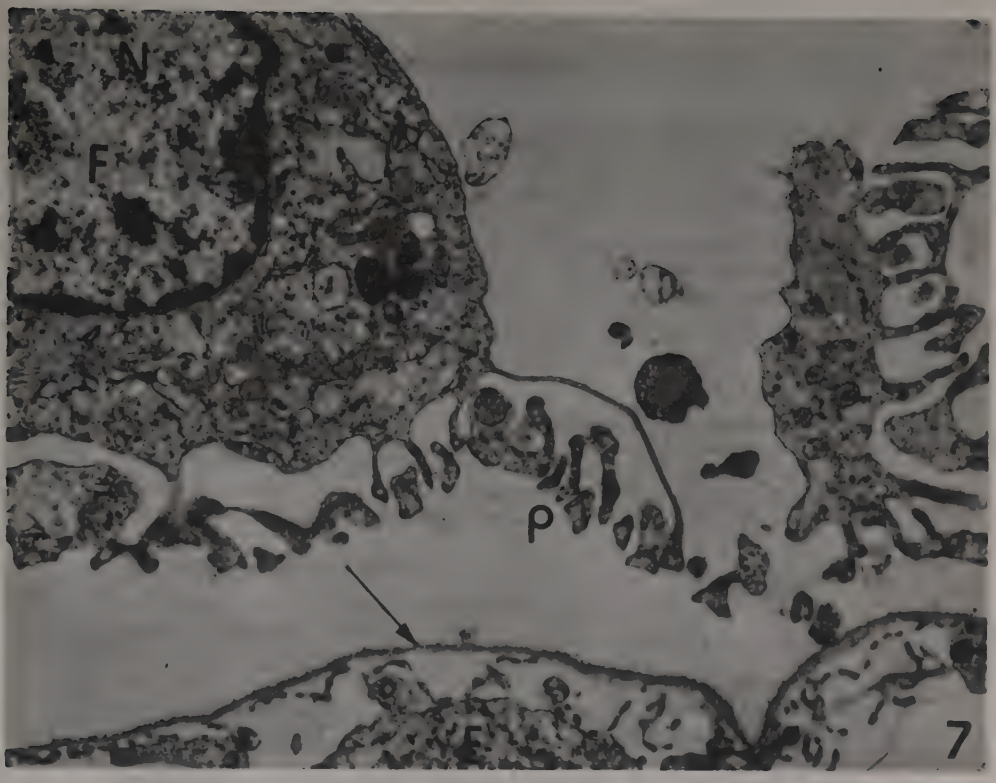
LEGENDES

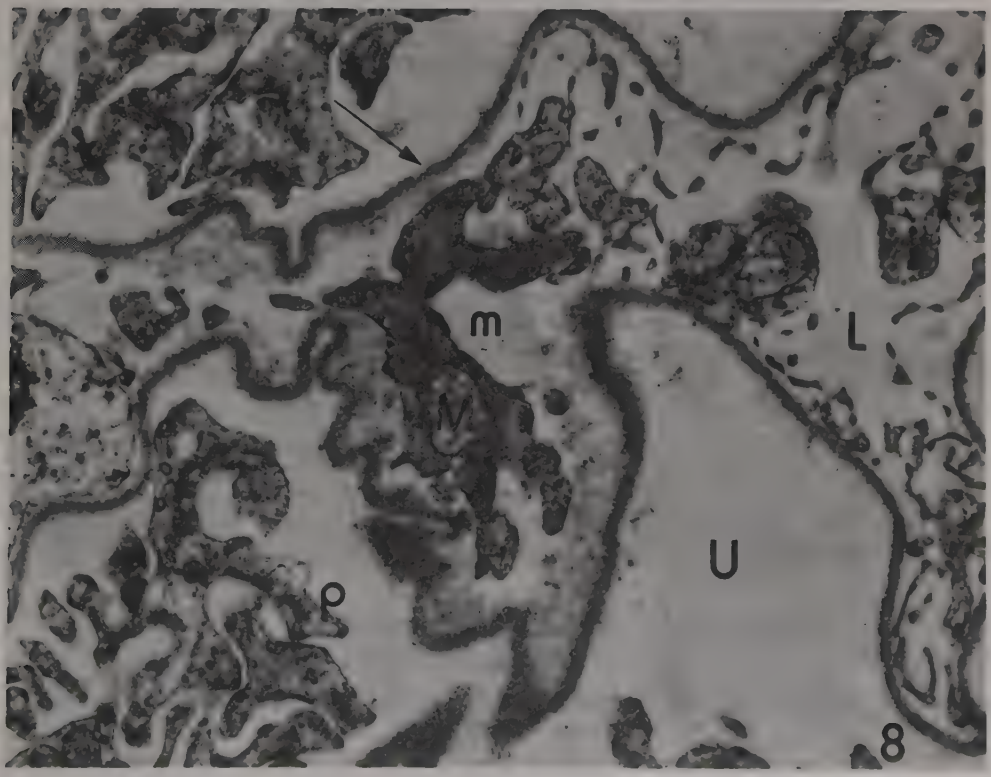
Figure 7 - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 4 h. Les pédicelles (p) se sont détachés de la membrane basale (flèche).*
Ils ne sont plus réunis par le slit membrane. La lamina fenestrata est également à distance de la membrane basale.

G = 9.000

Figure 8 - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 4 h.*
Région mésangiale, avec une cellule mésangiale (M) dont la densité du cytoplasme est due à la présence de microfibrilles, identiques à celles des rats témoins. Le réseau membranoïde (m) est estompé de manière irrégulière. La lamina densa (flèche) a des limites peu nettes et effilochées.
L : lumière - U : espace urinaire - p : pédicelles dans lesquels on ne retrouve aucun filament épais.

G = 15.500


N
F
P
F
7


m
L
M
U
P
8

III - DISCUSSION

Nous reprendrons point par point les différents résultats obtenus.

1 - INCLUSIONS FILAMENTEUSES INTRANUCLEAIRES

Des inclusions nucléaires de type frillaire ont été décrites par de nombreux auteurs, dans les cellules très diverses, d'espèces variées, tant dans le règne animal que dans le règne végétal.

Certaines sont observées spontanément : les plus étudiées ont été les inclusions nucléaires des neurones sympathiques (MASSUROWSKY, DIXON, SEITE (a,b)

Mais d'autres ont été observées dans :
- le système olfactif du chat (WILLEY)
- des cellules de gliome humain (EICHI - TANNI)
- des lymphomes du chien (RANGAN)
- diverses cellules endocriniennes : épidydime de chien (DUPUY - COIN)
  : cellules beta du pancréas (BOQUIST)

On en trouve également : - chez les invertébrés (ANDERSON, LE MOIGNE)
- chez les végétaux (WEIGIN)

Les aspects rencontrés sont assez proches, et peuvent se résumer à 2 structures principales :

a) des structures filamenteuses, faites de filaments ayant un diamètre de 50 à 100 Å, groupés en faisceaux pouvant atteindre plusieurs microns de longueur, et déjà décrits par PRENANT en 1897.

b) des structures paracristallines, de périodicité variable , oscillant entre 170 et 300 Å (EICHI TANNI, GAMBETTI).

Bien souvent, les inclusions filamenteuses et paracristallines sont associées, et parfois accompagnées de microtubules (SEITE), de corps granuleux, ou de corps nucléaires.

La nature et le rôle de ces divers éléments sont encore obscurs. Tous les auteurs admettent qu'il s'agit essentiellement de protéines. En ce qui concerne la forme géométrique variable de ces structures, tantôt filamenteuse, tantôt paracristalline, ailleurs mixte, elle est déterminée, comme le fait remarquer MASSUROWSKY, par l'état conformationnel des macromolécules qui les constituent, et dont l'aspect va dépendre de l'état physicochimique local :

- Force ionique
- pH local
- et d'autres facteurs influençant le micro-environnement

de ces éléments vont intervenir sur l'état de contraction, l'alignement, les pontages entre les filaments, etc..., et donner lieu à un arrangement tridimensionnel non univoque.

De plus, certains facteurs extrinsèques peuvent intervenir dans leur fréquence d'apparition :

a) Facteurs physiques : Radiations (MASSUROVSKY)
: Stimulation nerveuse (SEITE)

b) facteurs chimiques : action de l'actinonycine D sur les oocytes par exemple (LANE)

En ce qui concerne leur rôle, aucune explication n'est très satisfaisante, et plusieurs ont été avancées :

- élaboration par le nucléole de filaments, puis exportation dans le cytoplasme.

- dépôt d'une protéine dans le noyau au cours d'un «hyperfonctionnement» (?) cellulaire.

- inhibition de la RNA polymérase

- traduction d'une division amitotique

- matériel viral

Les structures observées dans notre étude ne sont pas très différentes de celles mentionnées dans les rapports que nous venons de citer.

Il est intéressant de noter qu'elles n'ont jamais été observées dans les cellules glomérulaires, tout au moins à notre connaissance.

La question se pose de savoir :

- s'il s'agit d'une structure fabriquée de toutes pièces par la trypsine et n'ayant aucune signification particulière

- ou bien si la trypsine, en permettant la formation de liaisons et l'élaboration d'édifices macromoléculaires, «démasque» des molécules préexistantes, semblables à celles que l'on observe spontanément dans d'autres cellules.

Nous penchons plutôt pour la seconde hypothèse, car ces inclusions filamenteuses sont retrouvées essentiellement dans les cellules podocytaires et mésangiales, exceptionnellement dans les cellules musculaires, jamais dans les cellules tubulaires.

Elles ont des rapports avec les pores nucléaires, et pourraient peut être jouer un rôle dans le transport de certaines substances dans le noyau ; ou bien intervenir sur les propriétés mécaniques du noyau : on sait que les noyaux des podocytes et des cellules mésangiales sont irréguliers et indentés.

Enfin, la trypsine pourrait ne pas agir directement en tant qu'enzyme protéolytique sur le noyau, mais de manière indirecte, du fait de perturbations membranaires par exemple : en effet, les inclusions filamenteuses sont observées pour des concentrations et des temps d'incubations qui n'entrainent pas d'altérations cytoplasmiques notables.

2 - FILAMENTS INTRACYTOPLASMIQUES DES CELLULES DU GLOMERULE

La nature des filaments observés dans les podocytes et les cellules mésangiales a suscité un regain d'intérêt en 1968, à la suite du travail de PEASE.

En effet, si leur existence est connue depuis longtemps, il n'y a que peu d'auteurs qui jusqu'à cette date envisageaient, qu'ils puissent jouer un rôle dans la contractilité des cellules podocytaires ou mésangiales (GOORMAGHTIGH, YAMADA, LATTA, OBERLING et HATT).

PEASE, par un procédé spécial de fixation utilisant une déshydratation inerte par le glycol, met en évidence dans les podocytes, les cellules mésangiales, la capsule de Bowmann et les cellules tubulaires, des filaments épais de 100 à 300 Å de diamètre, qu'il identifie à des filaments de myosine car semblables à ceux qu'il observe avec la même technique dans des muscles lisses ou striés.
Ainsi, des filaments que l'on observerait à l'état normal seraient des filaments d'actine (de 50 à 90 Å) alors que les filaments épais (supérieurs à 100 Å), instables et constitués de myosine, ne seraient pas conservés par les techniques de fixation traditionnelles.

Plusieurs autres travaux suggèrent une telle activité contractile des cellules glomérulaires et tubulaires :

- NEWSTEAD fait une revue de la taille des filaments observés dans les cellules du parenchyme rénal, et observe quelques filaments épais dans le tube proximal du rat (mais aucune micrographie de filaments de myosine dans les cellules mésangiales ou podocytaires n'illustre son article).
- HARPER met en évidence, par des procédés histochimiques, de la myosine dans les tubes et les glomérules.
- BERNICK constate que des glomérules humains en culture sont doués de mouvements de contraction et de relaxation, mais ces études cinématographiques ne permettent pas de conclure quelles sont les cellules qui se contractent, et l'auteur attribue ces mouvements aux cellules endothéliales.
- BECKER enfin, à l'aide d'anticorps anti-actomyosine trouve un marquage des cellules mésangiales.

Pour tenter de confirmer ces faits, nous avons utilisé la technique de Rosenbluth que nous discuterons en détail plus loin : nous n'avons pu mettre aucun filament épais en évidence. Nous ne nions aucunement l'existence de myosine dans les cellules du glomérule : la trypsinisation est une technique comportant plusieurs paramètres (concentration, temps d'incubation, température etc ...) qui nous a donné satisfaction au plan de l'étude des cellules musculaires lisses, mais qui n'est peut être pas adaptée à celles des glomérules.
D'autre part, la myosine contenue dans le glomérule doit être en quantité relativement faible, et cette méthode n'est peut être pas assez sensible.

3 - CELL COAT, SLIT MEMBRANE, ET MEMBRANE BASALE

A/ CELL COAT

La membrane plasmique de toutes les cellules est recouverte d'une couche macromoléculaire riche en mucosubstances acides, que l'on aappelée«cell coat», glycocalyx ou glycolemme.

Le cell coat est bien mis en évidence,en microscopie électronique, par divers procédés colorant les mucosubstances acides telles que : le fer colloïdal (GAZIC, JONES), l'oxyde de thorium colloïdal (RAMBOURG), le rouge de ruthénium (GRONIOWSKY).
On constate ainsi que le cell coat recouvre les podocytes, leurs pédicelles et la slit membrane. Le rôle du cell coat serait d'absorber les protéines se trouvant dans le filtrat glomérulaire, et surtout d'intervenir dans la filtration glomérulaire. En effet, LATTA a montré, en utilisant un traceur : l'hénoglobine, qu'à l'état normal, les pédicelles n'étaient pas très écartés les uns des autres, mais accolés sur toute leur hauteur, et séparés seulement par un interstice de 240 Å, c'est-à-dire 2 fois l'épaisseur du cell coat. Cet interstice serait entièrement occupé par le cell coat des 2 pédicelles contigus, et c'est à travers ce filtre que les protéines se frayent leur chemin.

Après trypsinisation, nous avons vu que le cell coat a une épaisseur diminuée : ce fait est connu depuis longtemps, et la trypsine est utilisée pour séparer les cellules les unes des autres ; or le cell coat est un facteur essentiel de l'adhésivité cellulaire. L'action de la trypsine pouvant s'expliquer à la fois par ses propriétés protéolytiques sur la fraction protéique du cell coat, mais également par des impuretés existant dans les préparations commerciales, et agissant sur la fraction glucidique.

Le fait que la slit membrane soit détruite est un argument supplémentaire pour en faire une spécialisation du cell coat.

B/ MEMBRANE BASALE ET RESEAU MEMBRANOIDE MESANGIAL

1/ MEMBRANE BASALE

On sait que la membrane basale est très superposable au collagène, à quelques différences près ; la principale étant le contingent glycoprotéique contenant environ 10 % de glucides.

GOEL a utilisé la digestion trypsique pour étudier le comportement de la membrane basale de l'ectoderme chez l'embryon de poulet. Il a pu montrer une digestion partielle, avec épaississement et diminution de la densité de la membrane basale.

Nous avons vu que la lamina densa est apparemment peu sensible à l'action de la trypsine, tout au moins morphologiquement. Par contre, les lamina rara externa et interna ne sont plus mises en évidence.

Deux explications peuvent être avancées :

1°) une action plus importante de la trypsine parce que la texture de ces 2 éléments est beaucoup plus lâche que la lamina densa.

2°) leur constitution chimique est proche de celle du cell coat. Ceci serait assez conforme aux résultats de RAMBOURG et JONES, qui montrent que, comme le cell coat, il existe une coloration des lamina rara par les colorants des mucosubstances acides, alors que la lamina densa n'est pas colorée.

Ainsi pourrait-on considérer la lamina rara externa comme le cell coat des podocytes, et l'interna comme celui des cellules endothéliales.

2/ LE RESEAU MEMBRANOIDE MESANGIAL

Le réseau membranoïde est en grande partie digéré par la trypsine. Ce comportement, différent de celui de la lamina densa, s'explique bien par la structure moins compacte du réseau membranoïde.

IV - ETUDE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES DES ARTERIOLES

1 - RAPPEL DE LA MORPHOLOGIE DES MYOFILAMENTS DANS LES CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Les études biochimiques ont révélé que les protéines contractiles extraites des muscles lisses se composaient essentiellement de trois sortes de protéines : l'actine, la myosine, et la tropomyosine B. Le mélange in vitro d'actine et de myosine aboutit à la formation d'actomyosine, qui est capable de se contracter en présence d'ATP.

Il est facile de reconnaitre, au microscope électronique les filaments d'actine, qui apparaissent sous forme de filaments fins, de 50 à 75 Å de diamètre, groupés en faisceaux, et dont la direction est grossièrement parallèle à l'axe de la cellule. Il est parfois observé (RICE) des zones où les filaments fins se groupent en arrangements réguliers et hexagonaux.

En ce qui concerne les filaments épais de myosine, les techniques de routine ne sont pas capables de les mettre en évidence : et pendant longtemps, leur existence n'a pu être affirmée. Plusieurs équipes cependant, ont dans des travaux récents, publiés des documents où l'on reconnait des filaments épais ; ils insistent tous sur les précautions techniques à utiliser lors de la fixation des échantillons :

. RICE, sur la musculature de l'intestin de cobaye, montré de nombreux filaments épais dont le diamètre est compris entre 120 à 200 Å, et qui sont observés sur le muscle fixé en contraction (induite par l'ATP). Ces filaments sont beaucoup moins nombreux sur le muscle relaxé par l'adrenaline.

. KELLY obtient également des filaments de 175 Å de diamètre, en fixant des muscles contractés par mise sous tension du gésier de poulet et des muscles de la paroi digestive du cobaye.

. SOMLYO décrit de façon constante, des filaments épais dans les muscles vasculaires contractés des mammifères. Ces filaments épais sont entourés d'une rosette de filaments fins. Des filaments de taille intermédiaire (120Å) sont également observés.

. DEVINE obtient des résultats identiques

. PEASE retrouve des filaments épais dans toutes les cellules musculaires (lisses et striées) grâce à la déshydratation inerte qui substitue l'eau par le glycol. Mais cette technique ne permet pas la conservation des filaments fins.

A l'opposé, PANNER et HONIG, nient l'existence de ces filaments épais de myosine en tant que constituants normaux du muscle lisse, et estiment que toutes les images rapportées sont des artefacts. Ils montrent des images globulaires attribuées à la myosine, avec une tête de 120 Å de longueur, et une queue de 15 à 20 Å d'épaisseur. Ces aspects sont obtenus sur du gésier, rapidement fixé dans les glutaraldehyde, sans post fixation.

. ROSENBLUTH, utilisant la trypsinisation, observe, sur le muscle de l'intestin de cobaye, de grandes quantités de filaments épais, qui sont groupés en amas, et séparés des filaments fins.
Cette segrégation est retrouvée par cet auteur tant dans le muscle lisse que le muscle strié.

2 - CELLULES MUSCULAIRES LISSES ARTERIOLAIRES APRES TRYPSINISATION

A/ RATS TEMOINS - Les myofilaments des témoins sont uniquement formés de filaments fins. Il n'a pas été vu de filaments épais ni d'images paracristallines.

B/ APRES TRYPSINISATION

- Des concentrations de 1 à 2 mg/ml de trypsine entrainent des lésions très modestes des cellules musculaires, mais pas de bouleversement apréciable dans l'aspect des myofilaments.

- A une concentration de 4 mg/ml, des modifications importantes s'observent, et nous insisterons essentiellement sur deux faits :

  . l'apparition de filaments épais
  . l'existence de structures paracristallines

1/ LES FILAMENTS EPAIS

Ils sont en nombre variable mais jamais très abondant, et surviennent dans des cellules qui présentent de notables altérations :

- oedeme cellulaire avec éclaircissement du cytoplasme, surtout en périphérie de la cellule. Assez souvent, les filaments fins restent au centre de la cellule, sont bordés par quelques corps denses au voisinage desquels s'observent des vacuoles dilatées du reticulum lisse, et sont entourés d'une zone claire de hyaloplasme.
- Altérations nucléaires, avec chromatine compacte
- Séparation des cellules les unes des autres ; cette dissociation s'observant après incubation prolongée, et surtout si la température est à 37°.

Les filaments épais (Figure 9) sont souvent groupés en amas de 20 ou 30, et leur orientation, au sein d'un même groupe, est grossièrement parallèle.

Ils ont la forme d'un losange très allongé, avec une partie centrale renflée, et des extrémités effilées.

Leur épaisseur est variable, car leur orientation est rarement parallèle au plan de la coupe, mais nous avons pu en mesurer dont la longueur atteignait 2 microns.

Les filaments épais peuvent s'observer :

- soit au sein d'un trousseau de filaments fins, et dans ce cas, leurs orientations sont parallèles. Il n'a pas été vu d'arrangements réguliers entre filaments fins et filaments épais, ni de ponts unissant ces deux types de filaments.
- ailleurs les filaments épais sont observés dans des expansions de la cellule («blebs») et dans ce cas, ils ne sont pas associés aux filaments fins.

Autour des filaments épais s'observe une atmosphère assez dense, très finement granulaire, qui semble enrober le filament épais et rend difficile la mesure exacte de leurs dimensions.
Nous n'avons pu mettre en évidence de périodicité le long des filaments épais.
Les corps denses restent toujours visibles et ne semblent pas affectés par la digestion protéolytique.

2/ LES STRUCTURES PARACRISTALLINES

Des inclusions paracristallines sont observées dans tous les cas où la concentration de la solution trypsique est de 4 mg/ml.

Plusieurs aspects peuvent être rencontrés, et correspondent vraisemblablement à des sections différentes d'une même structure, comme nous allons tenter de le démontrer.

a) Aspect de type I : il est représenté sur la figure 10. Il est formé par un réseau constitué de l'entrecroisement de deux séries de filaments parallèles, régulièrement espacés, et faisant entre eux un angle de 38 à 45°. Il n'est pas observé de périodicité le long

---

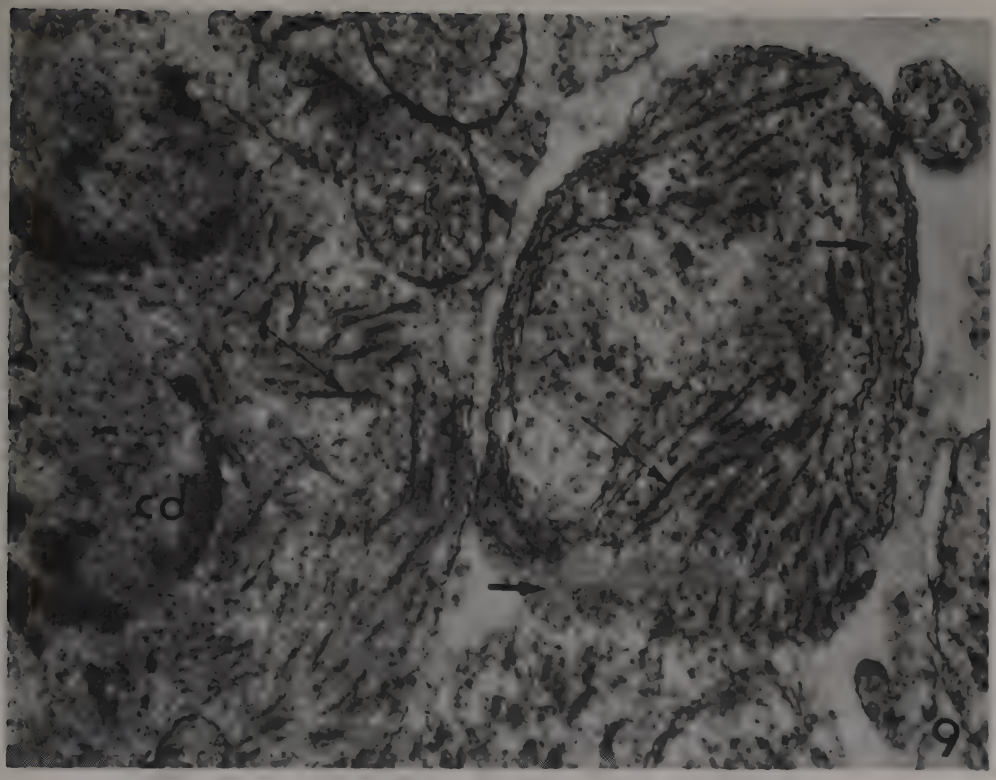
LEGENDES

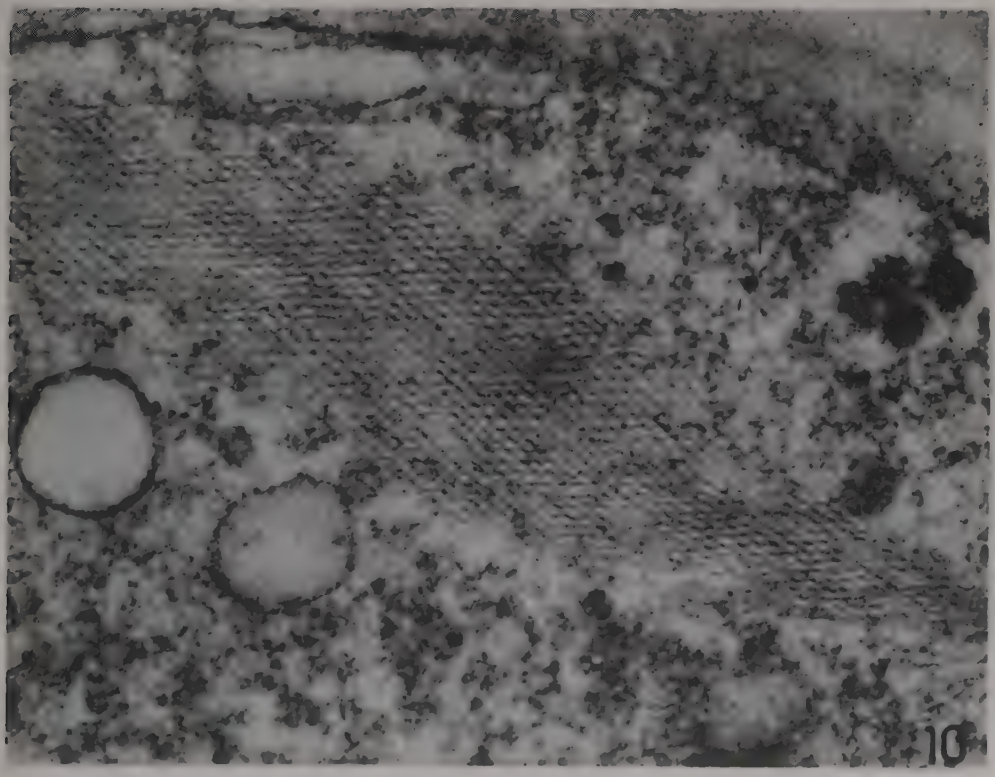
Figure 9 - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 4 h. Cellules musculaires lisses présentant des lésions assez serrées, et d'assez nombreux filaments épais de myosine (flèche fine). La flèche épaisse inférieure indique une structure paracristalline de type I, la flèche supérieure une image de type II - cd = corps denses.*

G = 29.000

Figure 10 - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 2 h. Structure paracristalline de type I dans une cellule musculaire lisse, constituée de deux séries de filaments parallèles, faisant un angle d'environ 40°. La périodicité est de 200 Å environ.*

G = 74.000


cd
9


10

de chaque filament. L'épaisseur des filaments est de 70 à 100 Å, identique pour chaque série de filaments, et la distance séparant 2 filaments parallèles est d'environ 200 Å ± 20 Å.
De telles structures peuvent atteindre plusieurs microns de longueur.

A côté de ces structures simples, rarement rencontrées, on trouve souvent des constructions plus complexes, réalisant des images de chevrons, de mosaiques (Figure 11) faites d'entrecroisements multiples de plusieurs séries de filaments.

b) Aspect de type II : il est représenté sur la figure 13c et 16b. Il est constitué par l'alignement de points ou plutôt de taches arrondies, de 70 à 80 Å de diamètre, séparés par une distance régulière de 170 à 200 Å. Les opacités reposent sur un filament dont la densité électronique est plus faible. Ce filament parait tangent aux opacités arrondies qui sont toujours situées du même côté que celui-ci.

Parfois il n'existe qu'un seul filament et par conséquent une seule série de points linéairement disposés le long de celui-ci. (Figure 9, flèche supérieure). Le filament peut être soit rectiligne, soit sinueux. Ailleurs, on assiste à un empilement de ces éléments, les filaments étant plus ou moins parallèles; la distance qui les sépare étant d'environ 170 Å (Figure 13).

c) Aspect de type III : Il est constitué par la juxtaposition d'éléments tubulaires (Figure 13b). Chaque tubule présentant une vague périodicité qu'il est difficile de déterminer sur les micrographies. Il existe en général plusieurs tubules associés, et la distance qui sépare les axes de 2 tubules adjacents est identique à celle séparant les filaments de la structure de type II.

Tels sont les trois aspects principaux que peuvent revêtir ces agencements paracristallins.
Plusieurs arguments nous font penser qu'il s'agit d'une seule et même structure :

. 1) l'association des aspects de divers types et leur transition progressive de l'un dans l'autre.

. 2) l'analyse de certaines images à l'aide de l'interférographe de WARREN.

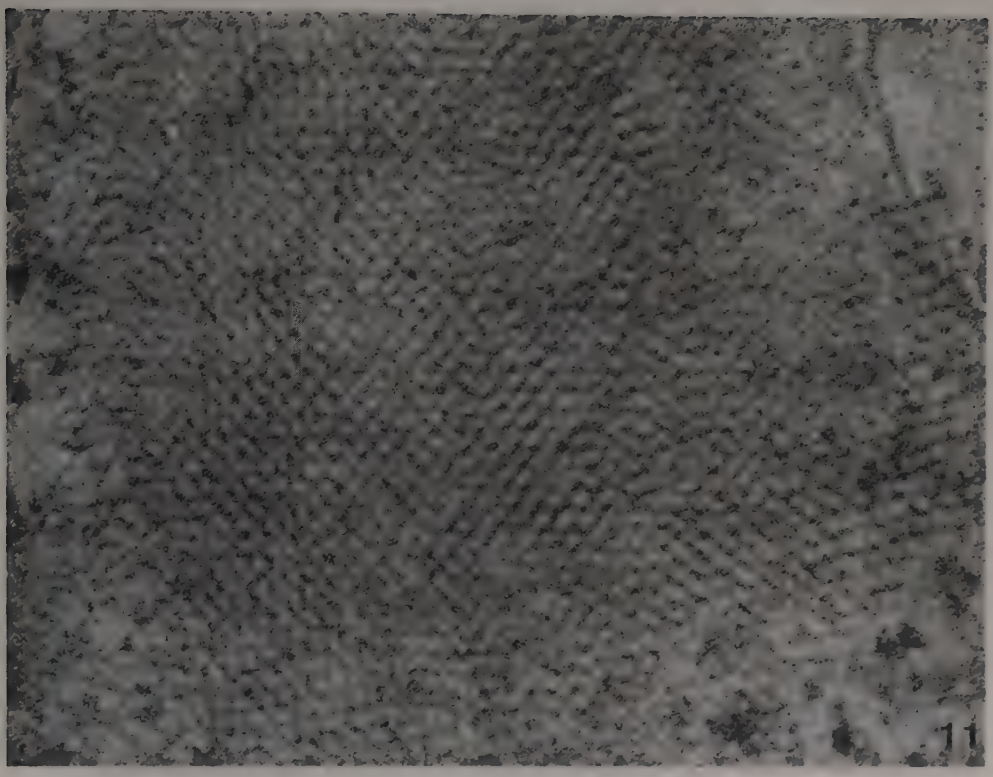
LEGENDES

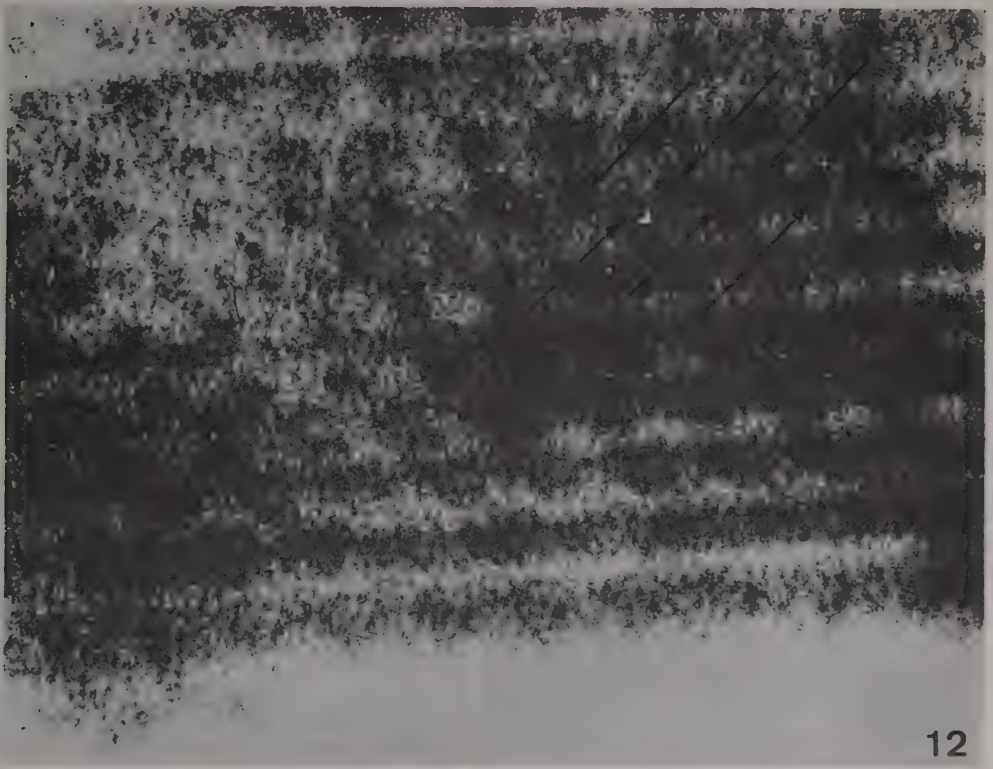
Figure 11 - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 4 h. Aspect plus complexe de structure paracristallines de type I*

G = 167.000

Figure 12 - *Transformation de la figure 13 b par l'interférographe : la périodicité des images tubulaires est bien mise en évidence. Celle-ci est complexe, et semble en fait être constituée de la répétition d'une unité faite de deux taches, disposées en quinconce selon le grand axe du tubule.*

G = 540.000


11


12

. 3) l'étude par la platine goniométrique

1) Association et transition : dans certaines cellules, on peut voir l'association de structures paracristallines de tous les types : la figure 9 présente par exemple une structure de type II et de type I, la figure 14b montre côte à côte des structures II et III.
D'autres micrographies montrent la transition de divers types au sein d'une même structure : la figure 14a (passage du type I au type III) et figure 13a (passage du type II au type III).

2) Transformation des images à l'aide de l'interferographe. Cet appareil est de peu d'intérêt lorsque la régularité des images est évidente, comme dans la figure 10. Par contre, il est très utile lorsque la périodicité est masquée par un bruit de fond important, ou bien à peine ébauchée.
Nous avons étudié ainsi la figure 13b, qui montre un aspect tubulaire de type III. La transformation de cette image permet d'obtenir la figure 12. Celle-ci n'est pas interprétable sur toute sa surface, mais elle permet de voir :

1) la périodicité de manière évidente
2) l'élément répétitif constituant cette périodicité, qui est formé de deux taches contigues, situées en quinconce par rapport à l'axe du tubule (flèches)

La ligne qui joint le centre de chaque opacité fait un angle de 23° avec l'axe du tubule.

3) Tous les arguments précédents peuvent être interprétés de 2 façons : - ou bien il existe des aspects conformationnels différents, se continuant l'un dans l'autre de manière insensible
- ou bien ces aspects représentent une même structure, pouvant prendre des orientations diverses dues à leur flexibilité.

La platine goniométrique, en modifiant l'orientation de la coupe de manière précise, permet de choisir le deuxième terme de cette alternative.

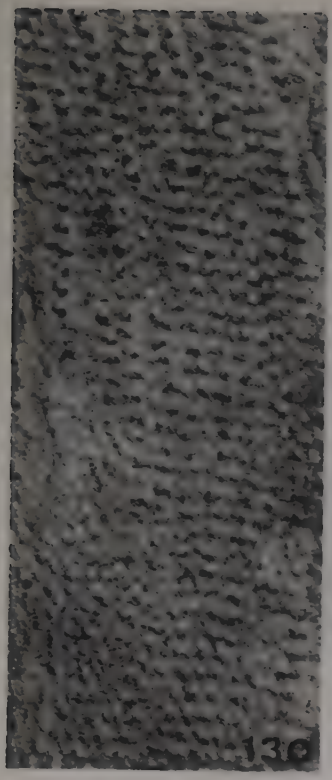
Nous avons étudié une structure de type II : elle est représentée par les 3 clichés de la figure 16.

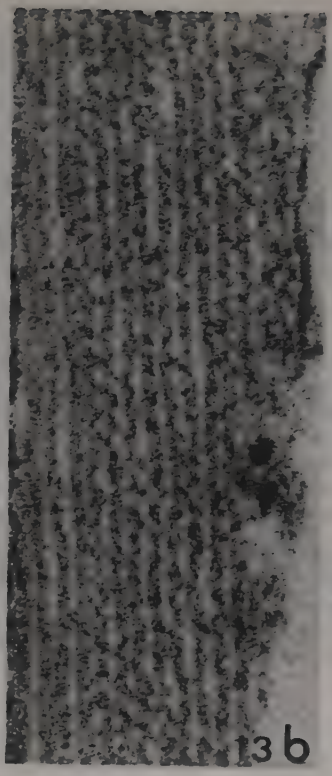
LEGENDES

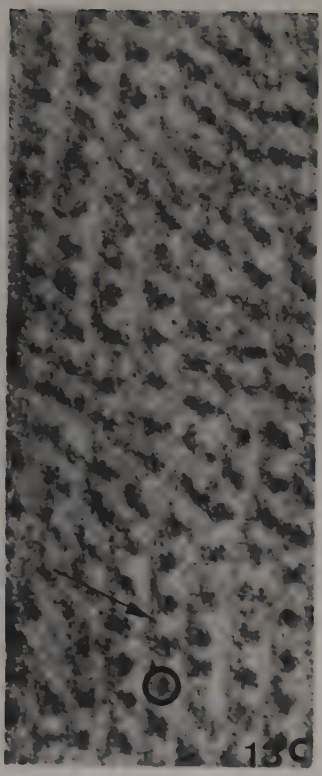
Figure 13 a-b-c - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 4 h, même cellule.*
a) G = 128.000 ; passage de l'aspect de type II (en haut) à l'ébauche de type I (en bas).
b) G = 154.000 ; aspect de type III, fait de tubules où l'on distingue vaguement une périodicité. Cf. Fig. 12 qui en est la transformation par intégration linéaire.
c) G = 290.000 ; aspect de type II, avec opacités arrondies (cercle) disposées le long d'un filament (flèche).

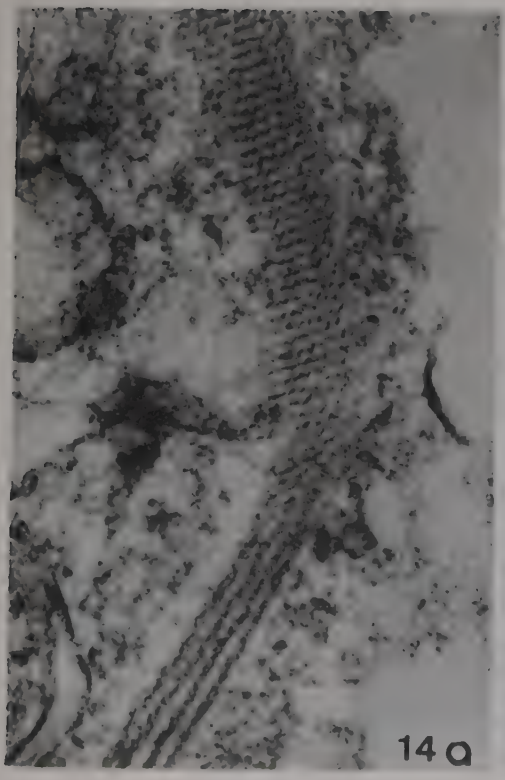
Figure 14 - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 4 h. Formes de passage entre les aspects II et III (fig. 14 a) et association des types II et III (fig. 14 b).*

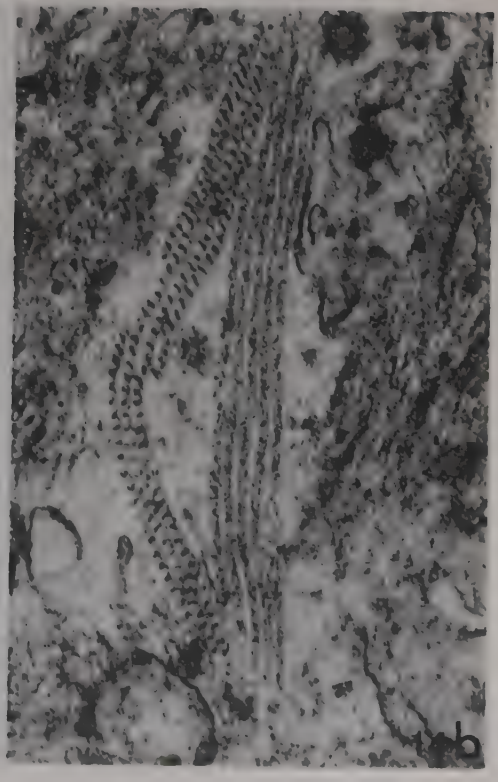
G = 83.700


13a


13 b


13c


14 a


b

La position zéro est représentée sur la figure 16b : on y voit la succession de points, situés à droite des filaments

- Une inclinaison de + 39° selon un axe horizontal, et perpendiculaire à celui des filaments, permet d'obtenir la figure 16a : on devine que les points sont situés à gauche des filaments, c'est-à-dire que les points sont devenus des filaments et vice-versa.

- une inclinaison de -50° aboutit à une structure tubulaire de type III, où l'on devine une périodicité.

Au terme de cette étude, nous proposons le modèle représenté sur la figure 15 : les structures cristallines sont constituées de l'empilement de plusieurs plans réticulaires ou couches.

Chaque couche est faite de l'entrecroisement de deux séries de filaments **parallèles**, faisant un angle de 40°. Les filaments de chaque série ne sont pas strictement dans le même plan, mais sont décalés d'environ 35 Å.

Il ne s'agit pas d'une structure cristalline proprement dite, car elle n'est pas répétitive dans les 3 dimensions de l'espace : il s'agit donc d'une structure paracristalline, faite de la juxtaposition de plans qui eux, ont un aspect cristallin dans 2 dimensions.

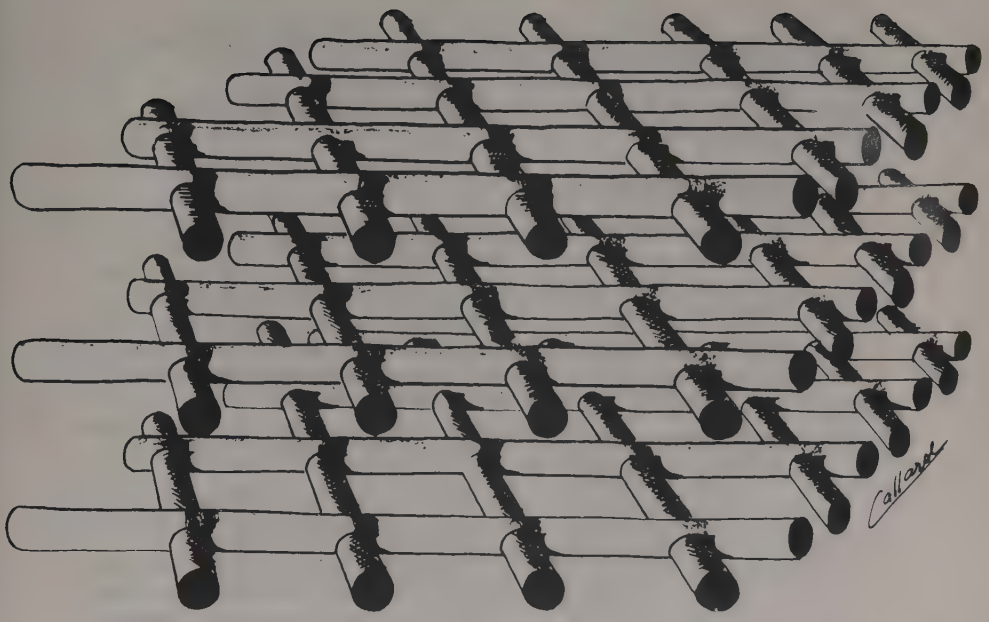
LEGENDES

Figure 15 - *Modèle proposé pour les structures paracristallines :*
Structure composée de couches superposées.
Chaque couche formée de deux réseaux de filaments parallèles équidistants ; ces deux réseaux légèrement décalés dans l'épaisseur, et se coupant à un angle voisin de 40°.
La direction des réseaux est la même pour chaque couche.

Figure 16 - *Incubation trypsique (4 mg/ml) pendant 4 h.*
Images obtenues par tilting

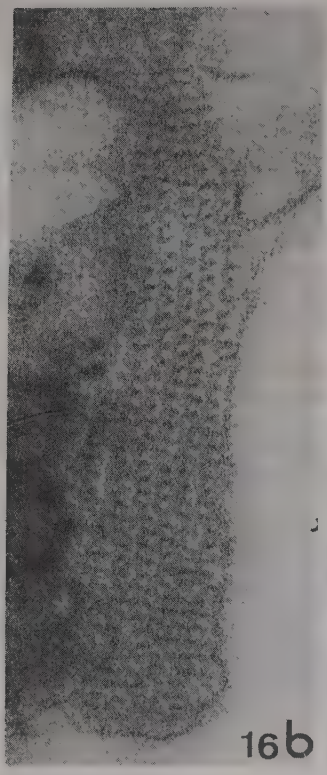
G = 98.500

La figure 16 b représente une structure de type II. Elle est formée d'une série de points alignés et de filaments ; les points se trouvent à droite des filaments.
Figure 16 a : rotation de +39° selon un axe perpendiculaire à l'axe de la structure, et situé dans le plan horizontal : cette fois, les points se trouvent situés à gauche des filaments.
Figure 16 c : rotation de -45° : on observe l'apparition d'une structure de type III.



15

16 a



16 b

16 c

3 - DISCUSSION

Nous commenterons successivement l'existence des filaments épais, puis celle des inclusions paracristallines.

A/ FILAMENTS EPAIS DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES APRES TRYPSINISATION

1/ SIGNIFICATION

Nous avons vu que plusieurs techniques utilisant des artifices divers (le terme artifice voulant simplement dire technique s'écartant de la routine), permettaient de mettre en évidence des filaments épais dans les cellules musculaires lisses. Il semble que la plupart des auteurs admettent qu'il s'agit de myosine, et que cet état d'aggrégation de la myosine existe, in vivo, sous forme filamentaire, et qu'ainsi la contraction musculaire lisse fait appel à un procédé identique à celui du muscle strié.

Mais d'autres (PANNER) pensent que s'il en était ainsi, on devrait obtenir :
- des images de diffraction des rayons X évocateurs de la myosine
- des arrangements réguliers des filaments fins et épais
- des images montrant la substructure de la myosine (tête ovoide, extrémité pointue)
- des micrographies de qualité suffisante pour révéler la structure globulaire de l'actine, et exclure la possibilité que les filaments de 140 Å soient dus à l'accolement de 2 filaments fins.

Estimant toutes ces conditions insatisfaites, l'auteur pense que la myosine n'existe in vivo que sous forme de dimère, et propose pour le muscle lisse, un modèle particulier de la contraction musculaire : celle-ci serait due à un glissement l'un sur l'autre, de 2 filaments d'actine de sens opposé, la myosine provoquant des ponts entre les 2 filaments fins.

Quoiqu'il en soit, après trypsinisation, la première question qui se pose est la suivante : de quoi sont constitués les filaments épais ? Plusieurs éléments permettent d'y répondre :

- Ils ressemblent aux filaments épais obtenus in vitro, à partir de l'extraction de la myosine du muscle lisse.

- Des aggregats de méromyosine légère obtenus in vitro, possèdent une forme identique, losangique, mais de taille plus volumineuse et plus irrégulière.

- Ils possèdent une périodicité de 143 Å (ROSENBLUTH) qui apparait lorsqu'on utilise comme fixateur le mélange Acroleine-Bichromate (Nous n'avons pas observé cette périodicité, car nous n'avons pas utilisé ce fixateur). Or, la myosine du muscle squelettique a une périodicité de 143 Å détectée par la diffraction aux rayons X.

En conclusion, avec ROSENBLUTH, nous pensons que les filaments épais obtenus après trypsinisation, sont vraisemblablement de la myosine, ou un mélange de myosine et de méromyosine légère.

La deuxième question est de savoir pourquoi ces filaments de myosine sont observés après trypsinisation, alors qu'ils sont absents sur les préparations standard

Plusieurs réponses peuvent être proposées :

1/ La conformation de la myosine dans le muscle lisse ne permet pas son aggrégation, exceptée après une dénaturation plus ou moins sévere, telle que : glycérinisation, déshydratation inerte, acidification, ou dans le cas présent, traitement protéolytique par la trypsine.

2/ A l'état normal, la myosine forme un complexe avec une autre protéine, qui prévient son aggrégation. La trypsine pourrait dénaturer une telle protéine, et provoquer l'aggrégation secondaire de la myosine

3/ La trypsine, en rompant les liaisons entre actine et myosine, entrainerait le ségrégation de ces 2 groupes de molécules, et de manière indirecte l'aggrégation in situ de la myosine

4/ De petites quantités de meromyosine légère pourraient être formées, et constituer un germe pour l'aggrégation de la myosine.

5/ Des modifications ioniques intracellulaires, entrainées par les altérations métaboliques secondaires à la trypsinisation pourraient favoriser l'aggrégation de la myosine.

De toutes ces hypothèses, la plus vraisemblable est la première, c'est-à-dire une modification de la molecule de myosine due à l'action protéolytique directe de l'enzyme.

2/ DIFFERENCES OBSERVEES ENTRE NOS RESULTATS ET CEUX DE ROSENBLUTH

Elles sont minimes : la forme et la taille des filaments épais sont identiques, mais leur arrangement au sein de la cellule musculaire est différent. En particulier, nous n'avons pas observé de ségrégation nette entre les 2 classes de filaments, ni obtenu les images en cocardes qu'il présente dans son article.

Nous n'avons pas obtenu de digestion des corps denses.

Ces différences pouvant s'expliquer soit par l'origine différente des préparations commerciales de trypsine, soit par un comportement non identique de la cellule musculaire du tube digestif de crapaud, et de celle de la paroi artériolaire du rein de rat.

En fait, il est probable que la différence des protocoles expérimentaux soit en grande partie responsable de ces petites divergences.

B/ STRUCTURES PARACRISTALLINES

Des structures cristallines on paracristallines se rencontrent spontanément dans le cytoplasme d'une grande variété de cellules : dans les tubes rénaux, proximaux (MAUNSBACH) ou collecteurs (MILLER), dans les plaquettes vitellines d'amphibiens (HOPE, KARASAKI, WARD, MASSOVER) dans le testicule : cristalloide de Rheinke (FAWCETT, NAGANO) dans le cerveau et certaines tumeurs (KOINOV, MISHIMA, RAMSEY), dans le foie humain (STERNLIEB, SCOTTO, FELDMANN) dans les mitochondries du foie (ROUILLER, RUFFOLO), de la corticosurrénale (FRUHLING, KJAERHEIM, MAGALHES, MENEGHELLI), de la thyroide (FUJITA), de la graisse brune (NAPOLITANO), dans l'appareil de Golgi (STRUNK), les microbodies (AFZELIUS) etc...

- En ce qui concerne les images paracristallines observées dans notre étude, plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

  a) la nature virale de ces inclusions est hautement improbable : il n'en n'a pas été vu chez les témoins, et les images cristallines virales ou associées aux virus n'ont pas cet aspect.

  b) Il est également peu concevable qu'il s'agisse de trypsine cristallisée : elle est très soluble, et d'autre part il n'en n'a jamais été observée à l'extérieur des cellules.

  c) Il est vraisemblable qu'il s'agit de protéines appartenant à la cellule musculaire lisse, puisqu'aucune autre cellule observée n'en possédait dans le cytoplasme.
  Si l'on admet qu'il s'agit bien de protéines de la cellule musculaire lisse, il est tentant de penser que :

  1/ ce sont des protéines fibreuses, car elles forment des aggregats macromoléculaires dont les constituants sont des filaments,
  2/ ce sont peut être des protéines contractiles.

- Parmi les protéines contractiles de la cellule musculaire lisse, l'actine, qu'il s'agisse de la forme «F» ou «G», ne polymerise jamais en un réseau cristallin.
- De même, la myosine, dont nous avons discuté les aspects, donne lieu à des aggregats losangiques, mais jamais à des réseaux, La même remarque s'applique aux différentes méromyosines

En ce qui concerne la tropomyosine B, plusieurs auteurs en ont décrit l'aspect au microscope électronique. Elle cristallise, d'après HIGASHI, selon des types polymorphes : le type I est un cristal dont l'unité de base est tétragonale, avec des côtés de 180 Å et 220 Å, le type IV cristallise en un réseau à 2 dimensions, de périodicité 400 Å, et de type tétragonal.

Les images des coupes longitudinales sont assez semblables à celles de nos résultats, par contre les coupes transversales sont toutes différentes.

En fait, si certaines analogies peuvent être trouvées entre les images paracristallines et les cristaux de tropomyosine B, il ne saurait être question de les confondre. Les différents protocoles expérimentaux expliqueraient très difficilement une telle divergence morphologique.

En conclusion, la nature de ces inclusions paracristallines reste mystérieuse : seule leur extraction permettrait leur analyse.
Celle-ci est rendue difficile par la fraction minime qu'elles représentent par rapport à la masse des cellules musculaires, et des autres cellules non musculaires.

Habituellement, si leur structure est plus ou moins bien définie, par contre leur nature chimique et leur signification est peu ou pas connue. En effet, ils représentent souvent une faible fraction du cytoplasme et pour cette raison, sont difficiles à isoler et à analyser biochimiquement.

Des inclusions cristallines induites par des drogues sont beaucoup plus rares : les alcaloides de la pervenche (BENSCH) sont bien connus pour provoquer des images cristallines, dont l'analyse a montré qu'il s'agissait de la juxtaposition de microtubules.

- A notre connaissance, des inclusions cristallines intramusculaires n'ont été rapportées qu'une seule fois : KJAERHEIM a observé dans le muscle strié d'un sujet atteint d'hyperlactacidémie congénitale des cristaux protéiques dans le sarcoplasme.

CONCLUSIONS

La perfusion intraartérielle du rein de rat par une solution de trypsine entraine plusieurs modifications dont les plus intéressantes affectent les artérioles et les glomérules.

1/ Dans les cellules musculaires lisses artériolaires s'observent à côté des filaments fins d'actine, pratiquement seuls visibles par les techniques de routine, une quantité notable de filaments épais, dont on sait qu'ils sont constitués de myosine.
En plus de ces deux structures filamentaires qui étaient attendues, nous avons observé la présence de profils paracristallins qui, à notre connaissance, n'ont pas été rapportés à ce jour.
L'analyse de nombreuses coupes sous diverses incidences, leur étude à l'aide d'une platine goniométrique, et la transformation de micrographies électroniques par un interférographe, nous ont conduit à proposer le modèle suivant : il s'agirait de la superposition de plusieurs couches, chacune étant constituée de l'entrecroisement de 2 réseaux de filaments parallèles équidistants.

La nature biochimique de ces structures est totalement inconnue, mais il est probable qu'il s'agit de protéines.
Certaines analogies existent entre ces structures et celles des cristaux de tropomyosine B étudiées in vitro, mais avec des différences sensibles. Les identifier à la cristallisation de protéines contractiles reste une hypothèse non confirmée.

2/ Ce protocole expérimental n'a pas permis de mettre en évidence des filaments épais de myosine dans les cellules mésangiales ou les podocytes.

3/ La digestion enzymatique rompt les ponts glycoprotéiques amarrant les cellules épithéliales et endothéliales sur la membrane basale : celle-ci est réduite à la lamina densa, et les podocytes flottent dans l'espace urinaire. Le cell coat qui normalement les recouvre a disparu, ainsi que la slit membrane.
Ce résultat est un argument supplémentaire pour faire de la slit membrane une spécialisation du cell coat.

4/ D'une manière constante, et pour de faibles concentrations de trypsine, il apparait dans les noyaux des cellules épithéliales et mésangiales, des trousseaux de microfibrilles qui possèdent parfois une périodicité. Un tel aspect est assez voisin des inclusions que l'on rencontre dans les noyaux normaux de diverses cellules, tant animales que végétales.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON W.A. (1968) - Intranuclear crystalline inclusions in spermatozoa of Lumbricus Terrestris
Protoplasma 66, 21

AFZELIUS B.A.(1965) - The occurence and structure of microbodies ; a comparative study
J. Cell Biol. 26, 835

BECKER C.G. (1972) - Demonstration of Actomyosin in Mesangial cells of the Renal Glomerulus
Amer. J. Path., 66, 97

BENSCH K.G. et MALAWISTA S.E. (1969) - Microtubular crystals in mammalian cells
J. Cell. Biol (40 : 95)

BERNIK M.B. (1969) - Contractile activity of human glomeruli in culture
Nephron : 6,1

BOQUIST L. (1969) - Intranuclear rods in pancreatic islet beta cells
J. Cell Biol. : 43,377

DIXON J.S. - Nuclear bodies in normal and chromatolysis sympathic neurons
Anatomical Records

DUPUY-COIN A.M., KALIFAT S.R. (1969) - Inclusions intranucleaires de type fibrillaire dans l'épidydime de chien
Ann. Anat path. 14, 231

FAWCETT D.W. et BURGOS M.H. (1960) - Studies on the fine structure of the mammalian testis II the human interstitial tissue
Amer. J. Ana 107, 245

FELDMAN G. et MOLAS G. (1970) - Inclusions cytoplasmiques paracristallines dans les hépatocytes chez l'homme
Bull. Assoc. Anatomistes 55è Congrès nº 149.

FRUHLING J., MENEGHELLI V. et CLAUDE A. (1968) - Inclusions tubulaires à organisation paracristalline et leurs rapports avec les crêtes dans les mitochondries de la corticosurrénale du rat et du boeuf.
J. Microscopie 7, 705

FUJITA H. et MACHINO M. (1964) - Fine structure of intramitochondrial crystals in rat thyroid follicular cell
J. Cell Biol. 23, 383-

GASIC G.J., BERWICK L. (1963) - Hale stain for sialic acid containing mucins - Adaptation to electron microscopy
J. Cell Biol. : 19,223

GOEL S.C. et JURAND A. (1968) - Electron microscopic observations on the basal lamina of chick limb buds after trypsin and EDTA treatment
J. Cell Sci. 3,373

GOORMAGHTIGH N. (1942) - La doctrine de la cellule musculaire afibrillaire endocrine en pathologie humaine : le rein de l'éclampsie puerpuerale
Bull. Acad R Med Belg 7,194

GRONIOWSKY J., BICZYSKOWA W., WALSKI M (1969) - Electron microscope - Studies on the surface coat of the nephron.
J. Cell Biol. 40,585

HARPER J.T. (1969) - Histochemical demonstration of myoepithelial filaments in tubular and glomerular epithelium of human kidney
Lab. Invert. 20,585

HIGASHI FUJIME et OOI T. (1969) - Electron microscopic studies on the crystal structure of tropomyosin
J. Microscopie 8, 535

HOPE J., HUMPHRIES A.A. et BOURNE G.H. (1964) - Ultrastructural studies on developing oocytes of the salamander triturus viridescens II. The formation of yolk
J. Ultrastructure Res. 3, 547

JAERHEIM A.K. (1971) - Cristals in skeletal muscle in congenital hyper lactacidémia
J. Ultrastruct Res. 36,538

JONES D.B. (1969) - Mucosubstances of the glomerulus
Lab. Invest. 21, 119

KARASAKI Sh. (1963) - Studies on amphibian yolk. I. The ultrastructure of the yolk platelet
J. Cell Biol 18, 135

KELLY R.E. Et RICE R.V. (1969) - Ultrastructural studies on the contractile mechanism of smooth muscle.
J. Cell Biol. (42 : 683)

KJAERHEIM A. (1967) - Crystallized tubules in the mitochondrial matrix of adrenal cortical cells
Exp. Cell Res. 45, 236

KOINOV R. (1967) - Crystal bodies in the ultrastructure of multiform glioblastoma.
Cancer 20, 1181

KRISHAN A. et HSU D. (1969) - Observations on the association of helical polyribosomes and filaments with vincristine - induced crystals in earle's l - cell fibrollasts.
J. Cell Biol. (43 : 553)

LANE NJ. (1969) - Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D - treated oocytes
J. Cell Biol. 40,285

LATTA H., MAUNSBACH AB (1962) - The justaglomerular apparatus as studied microscopically
J. Ultrastruct Res. 6,547

LATTA H. (1970) - The glomerular capillary wall
J. Cell Biol. 32,526

LE MOIGNE A. (1971) Etude en microscopie électronique d'inclusions nucléaires chez les Planaires
Journal de Microscopies : 20,107

LENNART BOQUIST (1969) - Intranuclear rods in pancreatic islet beta - cells
J. Cell Biol. (43 : 377)

MAGALHAES M.M. et MAGALHAES M.C. (1968) - Inclusions intramitochondriales à structure cristalline dans la surrénale du rat
J. Microscopie 7, 549

MASSOVER W.H. (1971) - Intramitochondrial yolk - Crystals of frog oocytes
J. Ultrastruct Res. (36 : 603)

MASUROVSKYE.B., BENITEZ H.H., KIM S.U., et MURRAY M.R. (1970) Origin, development, and nature of intranuclear rodlets and associated bodies in chicken sympathetic neurons.
J. Cell Biol. (44 : 173)

MASUROVSKY E.B., BENITEZ H., KIM S., MURRAY M. (1970) Origin, development and nature of intranuclear rodlets and associated bodies in chicken sympatic neurons
J. Cell Biol. 44,172

MAUNSBACH A.B. (1966) - Electron microscopic observations of cytoplasmic bodies with crystalline patterns in rat kidney proximal tubules cells.
J. Ultrastructure. Res. 14, 167

MENEGHELLI V., FRUHLING J. et CLAUDE A. (1967) - Inclusions à structure périodique dans les mitochondries de la zone fasciculée, plus rarement glomérulaire, de la surrénale chez le rat
J. Microscopie 6, 69

MILLER F. (1961) - Lipoprotein granules in the cortical collecting tubules of mouse kidney
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 157

MISHIMA Y. (1967) - Melanocytic and nevocytic malignant melanomas
Cancer 20, 632

NAPOLITANO L. et FAWCETT D.W. (1958) - The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat
J. Biophys. Biochem Cytol 4, 685

NEWSTEAD J.D. (1971) - Filaments in renal parenchymal and interstitial cells
J. Ultrastruct. Res. : 34,316

OBERLING C., HATT P.Y. (1960) - Etude de l'appareil juxta glomérulaire du rat au microscope électronique
Ann Anat Pathol 5,441

PANNER B.J. et HONIG C.R. (1970) - Locus and state of aggregation of myosin in tissue sections of vertebrate smooth muscle
J. Cell. Biol. (44 : 53)

PEASE D.C. (1968) - Myoid features of renal corpuscules and tubules
J. Ultrastruct. Res. 23, 304

PEASE D.C. (1968) - Structural features of unfixed mamalian smooth and striated muscles prepared by glycol dehydratation
J. Ultrastruct. Res. 23, 280

RAMBOURG A., LEBLOND C.P. (1967) - Electron microscopic observations on the carbohydrate - Rich cell coat present at the surface of cells in the rat
J. Cell. Biol. 32,27

RAMSEY H.J. (1967) - Altered synaptic terminals in cortex near tumor
Amer. J. Path. 51, 1093

RANGAN SRS., CALUERT R., VITOLS K. (1970) - Fibrillar bundles in canine lymphomas
J. Ultrastruct. Res. 36, 425

RANGAN, SRS, CALVERT R.C., VITOLS K. (1971) - Fibrillar bundles in canine lymphomas : an ultra structural study
J. Ultrastruct. Res. 36,425

RICE R.V., MOSES J.A., MANUS G.M., BRADY A.C., et BLASIK L.M. (1970) - The organisation of contractile filaments in a mammalian smooth muscle
J. Cell. Biol. (47 : 183)

ROSENBLUTH J. (1971) - Myosin like aggregates in trypsin treated smooth muscle cells
J. Cell Biol. 48, 174

ROUILLER C. et JEZEQUEL A.M. (1963) - Electron microscopy of the liver in the liver. Morphology, biochemistry, physiology
C. Rouillet ed., New York and London, Academic Press Inc. 1, 195-

RUFFOLO R. et COVING TON H. (1967) - Matrix inclusion bodies in the mitochondria of the human liver. Evidence of hepatocellular injury
Amer. J. Path 51, 101

SCOTTO J., STRALIN H., OPOLON P., CAROLI J. (1969) - Structures paracristallines dans les hepatocytes humains
Bid. Gastroent. 2, 161

SEITE R. (1969) - Recherche sur l'ultrastructure la nature et la signification des inclusions microfibrillaires paracristallines des neurones sympathiques.
Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 101, 621

SEITE R., ESCAIG J., COUINEAU S. (1971) - Microfilaments et microtubules nucleaires et organisation ultrastructure des batonnets intranucleaires des neurones sympathiques
J. Ultrastruct. Res. 37, 449

STERNLIEB I., et BERGER J.E. (1969) - Optical diffraction studies of crystalline structures in electron micrographs
J. Cell. Biol. (43 : 449)

STRUNK S.W. (1959) - The formation of intracellular crystals in midgut glands of limnoria lignorum
J. Biophys. Biochem. Cytol 5, 385

TANI E. (1971) - Intranuclear fibrillar arrays in human gliome cells
Cancer Res. : 31, 1210

THIERRY J.P. (1971) - Le cell coat
Congrès de microscopie électronique Caen

TOSHIO Nagano et IWAO OHTSUKI (1971) - Réinvestigation of the fine structure of Reinke's crystal in the human testicular interstitial cell
J. Cell Biol.

TUSQUES J. et PRADAL G. (1968) - Inclusions d'aspect filamenteux dans le noyau des cellules argyrophiles de la muqueuse gastrique du lapin ; mise en évidence en microscopie électronique
C.R. Acad. Sc. Paris : 267,1738

WARD R.T. (1962) - The origin of protein and ratty yolks in rana pipiens. II. Electron microscopical and cytochemical observations of young and mature oocytes
J. Cell Biol. 14, 309

WARREN R.C. et HICKS R.M. (1971) - A simple method of linear integration for resolving structure in periodic lattices : Application to an animal cell membrane and a crystalline inclusion.
J. Ultrastruct. Res. (36 : 861)

WERGIN W.P. (1970) - Fine structural investigations of nuclear inclusions in plants
J. Ultrastruct. Res. : 30,553

YAMADA E. (1955) - The fine structure of the renal glomerulus of the mouse.
J. Biophys. Biochem Cytol 1,155